

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

10/008,336

Attachment to #9

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-183969

(43) 公開日 平成6年(1994)7月5日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/40	ABA	9360-4C		
	ABE			
	ABF			
	ABG			
// C 0 7 D 207/44		8314-4C		

審査請求 未請求 請求項の数2(全 7 頁)

(21) 出願番号	特願平4-155580	(71) 出願人	000229519 日本ハム株式会社 大阪府大阪市中央区南本町3丁目6番14号
(22) 出願日	平成4年(1992)5月22日	(72) 発明者	中上 辰芳 大阪市中央区南本町3丁目6番14号
特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年3月25日 和漢医薬学会発行の「和漢医薬学会誌8巻3号」に発表		(72) 発明者	豊村 浩司 大阪市中央区南本町3丁目6番14号
		(72) 発明者	中村 丈志 大阪市中央区南本町3丁目6番14号
		(72) 発明者	藤田 平 大阪市中央区南本町3丁目6番14号
		(74) 代理人	弁理士 廣瀬 孝美

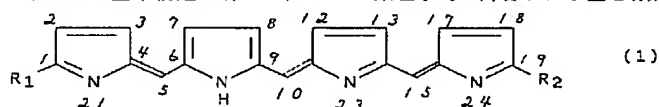
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗補体剤

(57) 【要約】 (修正有)

【構成】 一般式(1)で示される基本構造を有し、置*

*換基を有していてもよいテトラピロール誘導体又はその薬理学的に許容される塩を有効成分とする抗補体剤。



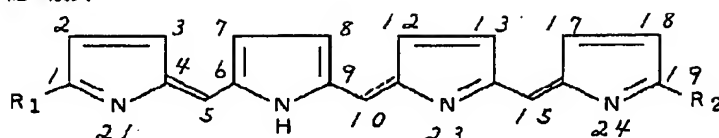
(式中、R¹及びR²はそれぞれ水酸基又は置換された水酸基を示し、10位の炭素と11位の炭素の間は一重結合又は二重結合を示す)

【効果】 式(1)のテトラピロール誘導体よりなる抗補体剤は、補体反応による疾病(例えば、炎症、アレルギー疾患など)の治療・予防に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記一般式



(式中、R¹及びR²はそれぞれ水酸基又は置換された水酸基を示し、10位の炭素と11位の炭素の間は一重結合又は二重結合を示す)で示される基本構造を有し、該構造式の2位、3位、7位、8位、12位、13位、17位及び18位に置換基を有していてもよいテトラピロール誘導体又はその薬理学的に許容される塩を有効成分とする抗補体剤。

【請求項2】 有効成分がビリベルジン又はその薬理学的に許容される塩である請求項1記載の抗補体剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は抗補体剤に関し、より詳細には、テトラピロール誘導体を有効成分とする抗補体剤に関する。

【0002】

【従来の技術】従来から消炎、アレルギー抑制、免疫反応抑制などを目的として種々の薬剤が用いられているが、薬効の面や副作用の面から新たな治療手段・方法が切望されている。そのような新たな治療手段として、抗補体活性を有する物質(抗補体剤)を用いて補体反応を阻害したり調整する抗補体療法が提案されている。補体は血清中に存在する蛋白質であり、約20種類の補体が知られているが、主たる成分はC1～C9の9種である。補体は、抗原抗体複合体、細菌細胞壁などの種々の物質により活性化され、細胞溶解反応などの生物活性を示す。補体が活性化されていく経路には、古典的経路(classical pathway)と代替経路(alternative pathway)の2種類の系があり、古典的経路は抗原抗体複合体に補体成分が順次結合して活性化されていく経路であり、最初はC1から始まり、C4、C2、C3、C5、C6、C7、C8、C9と活性化され、膜傷害性複合体が形成されて細胞溶解を誘発する。一方、代替経路は、C3の活性化から始まる経路である。また、このような補体の活性化に伴い、アナフィラトキシンが産生され、肥満細胞からヒスタミンを遊離する。生体内のアレルギー反応や※

*【化1】

*

※免疫反応も最終的には炎症反応として発現され、組織障害を引き起こす。炎症反応は、補体系、凝固系、線溶系、カリクレイン・キニン系、レニン・アンギオテンシン血圧調節系などの生体反応系が複雑な相互関係を形成してもたらされる。このように補体の作用により炎症反応は増幅されるので、補体系の過剰な反応を阻止することにより炎症を鎮静化させることが可能となる。抗補体療法は、このような観点から、補体反応を阻害ないしは調整することにより、炎症を鎮め、組織障害を防止する治療法である。

【0003】

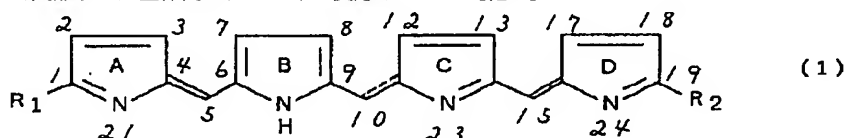
【発明が解決しようとする課題】補体反応を阻害ないしは調整する薬剤としては、アミノ酸系化合物(例えば、イブシロンアミノカプロン酸など)、SH化合物(例えば、システイン、グルタチオンなど)、ポリアニオン系化合物(例えば、デキストランサルフェート、ヘパリンなど)、非ステロイド系消炎剤(例えば、フルフェナム酸、メフェナム酸など)等が知られている。しかし、これらの薬剤は、その効果が不十分であったり、副作用を有するなどの問題があり、新たな抗補体剤が望まれている。本発明は上記の課題に鑑みてなされたもので、本発明者らが種々の検討を重ねた結果、特定のテトラピロール誘導体が顕著な抗補体活性を有することを見出して完成したもので、本発明は新規な抗補体剤を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するためになされた本発明の抗補体剤は、下記構造式(1)で示される基本構造を有し、該構造式(1)の2位、3位、7位、8位、12位、13位、17位及び18位に置換基を有していてもよいテトラピロール誘導体又はその薬理学的に許容される塩を有効成分とするものである。

【0005】

【化2】

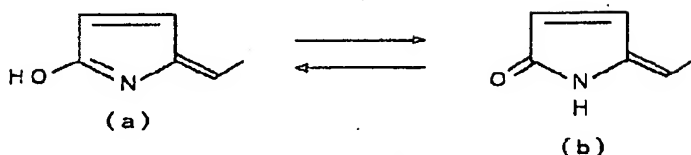


【0006】(式中、R¹及びR²はそれぞれ水酸基又は置換された水酸基を示し、10位の炭素と11位の炭素の間は一重結合又は二重結合を示す)上記構造式(1)

においては、便宜上、左側の環より順にA～Dの記号を付した。また、構造式(1)の両端のA環及びD環において、基R¹及び/又はR²が水酸基の場合、該環は下記

部分構造式 (a) 及び (b) で示されるエノールーケトの互変異性をとりえることは当業者に広く知られている。

* [0007]
[化3]



【0008】本明細書においては、このような互変異性体を、便宜上、部分構造式 (a) で表すものとする。本発明の抗補体剤の有効成分は、上記の構造式 (1) で表される基本構造を有し、該構造式の2位、3位、7位、8位、12位、13位、17位及び18位に置換基を有していてもよいテトラピロール誘導体又はその薬理学的に許容される塩である。薬理学的に許容される塩としては、アルカリ金属塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩など）、アルカリ土類金属塩（マグネシウム塩、カルシウム塩など）のような無機金属塩、アンモニウム塩、有機塩基塩（例えば、トリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ピリジン塩、ピコリン塩など）、有機酸塩（例えば、ギ酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩など）、無機酸塩（例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩など）等が挙げられる。

【0009】また、構造式 (1) の2位、3位、7位、8位、12位、13位、17位及び18位に置換し得る基としては種々の置換基が挙げられるが、好適には、例えば、低級アルキル基（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、イソブチル、第三級ブチル、ペンチル、ヘキシルなど）、アルケニル基（例えば、ビニル、アリル、1-プロペニル、3-ブテニル、4-ペンテニル、5-ヘキセニル、フィチル、フェーネシルなど）、カルボキシアルキル基及びエステル化されたカルボキシアルキル基（例えば、カルボキシメチル、カルボキシエチル、メトキシカルボニルメチル、エトキシカルボニルエチル、グルクロニドカルボニルエチルなど）等が挙げられる。R¹ 及び R² の置換された水酸基としては、例えば、アシルオキシ基（例えば、アセトキシ、プロピオニルオキシ、ベンゾイルオキシなど）、アルコキシ基（例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、第三級ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシなど）等が挙げられる。

【0010】本発明の抗補体の有効成分であるテトラピロール誘導体は、胆汁色素等の天然成分から採取することができ、また人工的に合成されたものでもよく、さらに胆汁色素自体を使用することもできる。特に好適な化合物としては、ビリベルジン（以下、BVという）及びビリルビンが挙げられ、これらの化合物は作用に優れると共に正常代謝産物であり副作用も少ないという利点を

有し、BVが特に好ましい。本発明の抗補体剤は補体系が関与する炎症反応の鎮静化に有用であり、具体的には、例えば、ヒトをはじめとするウシ、ウマ、ブタ、ヒツジなどの哺乳動物のI型アレルギー、III型アレルギー、膠原病（例えば、全身性エリテマトーデス、進行性全身性硬化症、結節性多発性動脈炎、リウマチ熱、関節リウマチ、皮膚筋炎など）等の治療・予防に用いられる。

【0011】本発明の抗補体剤において、有効成分の投与量は、患者の年齢、体重、症状、疾患の程度、投与経路、投与スケジュール、製剤形態等により、適宜選択・決定されるが、例えば、経口投与の場合、一般に1日当り0.5～300mg/kg体重程度とされる。本発明の抗補体剤は、経口投与又は非経口投与のいずれも採用することができる。投与に際しては、有効成分を経口投与、直腸内投与、注射等の投与方法に適した固体又は液体の医薬用無毒性担体と混合して、慣用の医薬製剤の形態で投与することができる。このような製剤としては、例えば、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等の固形剤、溶液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤、凍結乾燥製剤等が挙げられ、これらの製剤は製剤上の常套手段により調製することができる。上記の医薬用無毒性担体としては、例えば、グルコース、乳糖、ショ糖、澱粉、マンニトール、デキストリン、脂肪酸グリセリド、ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチルデンプン、エチレングリコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、アミノ酸、ゼラチン、アルブミン、水、生理食塩水等が挙げられる。また、必要に応じて、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、結合剤、等張化剤等の慣用の添加剤を適宜添加することができる。より具体的には、経口製剤とする場合には、例えば、有効成分を非イオン系界面活性剤のような分散剤を用いて懸濁液とし、糖、糖アルコール、無水ケイ酸、非イオン界面活性剤等のような崩壊剤を添加した後、凍結乾燥して粉末化し、常法に準じて、任意の剤形（例えば、カプセル、散剤、粗粒剤、顆粒剤、錠剤、液剤等）に製剤化することにより得られ、また特開昭60-208910号公報、特開昭61-27965号公報等に記載のリボソーム化法を用いれば、リボソーム製剤とすることができる。また、静注製剤とする場合には、有効成分を、例えば、界面活性剤による乳化、シクロデキストリンによる包接化、リボソーム化、脂肪乳剤

化等の慣用の手段を用いて製剤化することにより得られる。

【0012】

【発明の効果】本発明の抗補体剤の有効成分である前記テトラピロール誘導体及びその塩は、補体反応の古典的活性化経路の阻害作用、特に補体C1に対する直接的阻害作用を有する。従って、当該テトラピロール誘導体及びその塩を有効成分として含有する本発明の抗補体剤は、補体反応により発生しない増幅する疾病（例えば、炎症、アレルギー疾患等）の予防、治療などに極めて有用である。

【0013】

【実施例】以下、実施例及び試験例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

実施例1

BV(20g)を5%ポリオキシエチレンポリオキシシロピレングリコール水溶液50mlに懸濁し、ガラスビーズを用いて湿式粉碎を行った。次いで、得られた粉碎液50mlにショ糖脂肪酸エステル30gを加え、ドライアイス・メタノール浴で凍結後、乾燥して凍結乾燥剤を調製した。

【0014】実施例2

BV(1.8mg)を12.5%(W/V)ジメチルβ型シクロデキストリンを含むウィテプゾルW-35坐剤用基剤(45mg)に加熱分散した後、常法により坐剤を調製した。

【0015】試験例

本発明の抗補体剤の効果を調べるため、有効成分の一種であるBVについて、補体関与溶血反応抑制試験及び補体関与アレルギー反応抑制試験で抗補体作用を試験した。以下、その方法及び試験結果を示す。なお、使用した材料及びその調製法は以下のとおりである。

①BV：BVはウシ胆汁由来BV(シグマ社製)を用いた。

②補体及び補体成分：モルモット補体(以下、gpcという)血清は、Inoueら(J. Immunol., 119, p65-72, 1977)の方法により調製した。また、モルモットC1並びにヒトC4及びC2はKinoshitaら(J. Biol. Chem., 265, 14444-14449, 1990)の方法により調製した。ヒトC1はダイアメディクス社より入手したものを使用した。

③ヒツジ赤血球：ヒツジ赤血球(以下、SRBCという)は大阪大学微生物病研究所より入手したものを使用した。

④家兎抗SRBC抗血清：家兎抗SRBC抗血清は、熱変性SRBCを用い、Mayer(Experimental Immunology 2nd ed. Vol. III, p133, 1961)の方法により調製した。

⑤緩衝液：下記の緩衝液を使用した。

GV B：上記Mayerの文献記載の方法に準じて調製し

た、0.1%ゼラチンを含有する等張化ペロナル緩衝食塩水(pH7.3)。

DGV B：2.5%デキストロース、0.15mM塩化カルシウム及び1mM塩化マグネシウムを含有するGV B(pH7.3)。

EDTA-GV B：9容量部のGV Bと1容量部の0.1M EDTA-Na₃からなる緩衝液(pH7.3)。

⑥抗体及び補体で感作したヒツジ赤血球(中間体細胞)の調製：抗体感作ヒツジ赤血球(以下、EAという)と補体(C)との結合は、Kinoshitaら(Biochem. J., 261, p743-748, 1989)の方法に準じて行った。その概略は以下のとおりである。EAC1は、EA(10⁸細胞/ml)とC1(200単位/ml)とを、DGV B中、30℃で15分間インキュベートすることにより調製した。EAC14は、EAC1(10⁸細胞/ml)と等容量のC4(濃度：0.2-10μg/ml)とを、DGV B中、30℃で30分間インキュベートすることにより調製した。EAC142は、EAC14(10⁸細胞/ml)と等容量のC2(濃度：400単位/ml)とを、DGV B中、30℃で10分間インキュベートすることにより調製した。

【0016】本発明における補体関与溶血反応抑制試験の反応工程式を図1に示す。即ち、gpc、C1、C4、C2又はC-EDTAを、抗補体剤の存在下又は非存在下に、EA又は適当な中間体細胞とインキュベートし、溶血反応の終了後、溶血率を測定し、溶血に対するBVの効果を評価した。以下、具体的に説明する。

試験例1(補体関与溶血反応抑制試験1)

EA(10⁸細胞/ml)とgpc血清(3200倍希釈)とを、BVの存在下又は非存在下に、DGV B中、攪拌しながら37℃で1時間インキュベートした。5分間冷却した後、上清の吸光度(412nm)を測定し、溶血率(%)を求めた。また、BVに代えてコンジュゲートビリルビン(以下、CBRという)を用い、同様な試験を行った。その結果を図2に示す。また、EA(10⁸細胞/ml)を、DGV B中、37℃で10、30又は60分間の条件でBV(0又は40μg/ml)とインキュベートし、洗浄する前処理を行った。かくして得られたBV前処理EAを用い、上記と同様にしてgpc血清(3200倍希釈)とインキュベートし、溶血率を求めた。その結果を図3に示す。なお、BV及びCBRは純DMSOに溶解し、次いで反応緩衝液に添加した。最終DMSO濃度は0.5%となるように調整した(以下の試験においても同様である)。図2に示されるように、BVは濃度0-40μg/mlの範囲で、CBRは0-80μg/mlの範囲で濃度依存的にgpc関与溶血反応を阻害することが明らかとなった。また、図3に示されるように、BVで前処理したEAにおいては、インキュベーション時間が60分間の場合にも、BVにはgpc関与溶血反応に対する阻害作用は認められなかった。このことから、BVは補体に作用しているこ

とが明らかとなった。

【0017】試験例2（補体関与溶血反応抑制試験2）
試験する各補体成分（C1、C4又はC2）を、BVの存在下又は非存在下に、前述した適当な中間体細胞とDGVB中、攪拌しながら37℃で1時間インキュベートした。生成したEAC142は、最終的にgpc血清と、EDTA-GVB中、攪拌下、37℃で1時間インキュベートした（C-EDTA）。次いで、溶血率を測定し、各補体成分に対するBVの溶血反応阻害効果を評価した。その結果を図4に示す。なお、図中、黒丸はヒト補体を、白丸はモルモット補体を示す。図4のA～Dをより具体的に説明する。

【0018】A：EA（ 10^8 細胞/ml）と10単位/mlのヒト補体C1（黒丸）又はモルモット補体C1（白丸）とを、BVの存在下、30℃で10分間インキュベートし、次いで洗浄しBVを除去した。EAC142は、前述の「抗体及び補体で感作したヒツジ赤血球（中間体細胞）の調製」の項で述べた方法で、EAC1から調製した。生成したEAC142は、最終的に、70倍に希釈したgpcを等容量用いて、EDTA-GVB中、37℃、1時間の条件で溶解し、溶血率を測定した。

B：EAC1（ 10^8 細胞/ml）と等容量のC4（ $15.2\mu\text{g/ml}$ ）とをBVの存在下、30℃で10分間インキュベートし、次いで洗浄しBVを除去した。生成したEAC14の溶血率は、上記と同様にして測定した。

C：EAC14（ 10^8 細胞/ml）と等容量のC2（10単位/ml）とをBVの存在下、30℃で10分間インキュベートし、次いで洗浄しBVを除去した。生成したEAC142の溶血率は、上記と同様にして測定した。

D：EAC142（ 10^8 細胞/ml）は、1600倍に希釈したgpc血清を等容量用いて、BVの存在下、EDTA-GVB中、37℃、1時間の条件で溶解し、次いで溶血率を測定した。

【0019】図4に示されるように、BVはC1ステップの処理において顕著な溶血反応阻害効果を示し、特にBV濃度 $40\mu\text{g/ml}$ においては約90%の阻害率を示した。それに対して、C4及びC2ステップの処理に

おいては、BVは溶血反応阻害効果を示さなかった。このことから、BVは補体C1に対して阻害作用を示すことが明らかとなった。また、C-EDTA（補体成分として、C3、C5、C6、C7、C8及びC9なども含まれている）ステップの処理においても、BVは緩やかな溶血反応阻害効果を示した。

【0020】本発明の抗補体剤の補体関与アレルギー反応抑制を、モルモット・フォルスマンアナフィラキシー試験で試験した。すなわち、フォルスマンアナフィラキシーは補体反応が関与したアナフィラキシーであり、フォルスマン抗血清を静注されたモルモットはアナフィラキシーを惹起し、虚脱状態となり、約5分後に死亡する。このアナフィラキシーの抑制により抗補体活性を評価した。その方法及び結果は以下のとおりである。

試験例3（補体関与アレルギー反応抑制試験）

モルモット・フォルスマンアナフィラキシーを、Pelczarskaら（J. Pharmacol. Exp. Therapeut., 185, p116-125, 1973）の方法に準じて誘発させた。概略を示すと、フォルスマン抗血清は、1.0mlの10%SRBC懸濁液（日本抗体社製）を1日おきに静注された雄性白子兎から調製した。最終投与17日後、血清を集め、凍結して保存した。雄性ハートレイモルモット（体重300-400g）に上記血清を静注（投与量： 1ml/kg 体重）し、アナフィラキシーを惹起させた。試験薬剤は、血清の静注の2分前に静注投与するか、又は血清の静注の1時間前に経口投与した。薬剤投与後60分の実験動物の状態を観察するとともに薬剤投与24時間後の生存動物数を数え、抗補体活性を評価した。また、抗補体作用を有する非ステロイド系消炎剤であるフルフェナム酸（シグマ社製）を比較薬剤として用いた。なお、BV及びフルフェナム酸は生理食塩水に懸濁させたもの（BV濃度： 0.5mg/ml 、 2.5mg/ml 又は 25mg/ml ；フルフェナム酸： 2.5mg/ml 又は 25mg/ml ）を投与した。コントロール群の実験動物には、静注投与の場合には生理食塩水（ 1ml/kg ）を、経口投与の場合は蒸留水（ 2ml/kg ）を投与した。試験結果を表1に示す。

【0021】

【表1】

表 1

処 置		投与量(mg/kg)	動物数(生存数/総数)
i.v.	コントロール	—	0 / 8
	ビリベルジン	1	0 / 6
		5	3 / 10
	フルフェナム酸	5	1 / 11
p.o.	コントロール	—	0 / 10
	ビリベルジン	5	5 / 10
		50	3 / 12
	フルフェナム酸	50	2 / 10

【0022】表1に示されるように、静注投与の場合、BVは5mg/kgの投与量で高い生存率を示し、また死亡時間の有意な遅延も認められた。経口投与の場合、BVはアナフィラキシーにより誘発される死亡に対して有効であり、5mg/kgの投与量で50%という高い生存率を示した。このことから、BVは高い抗補体活性を有することが判明した。一方、比較薬剤であるフルフェナム酸は、静注及び経口のいずれの投与方法でもアナフィラキシーを抑制したが、その効果はBVより弱いものであった。

【図面の簡単な説明】

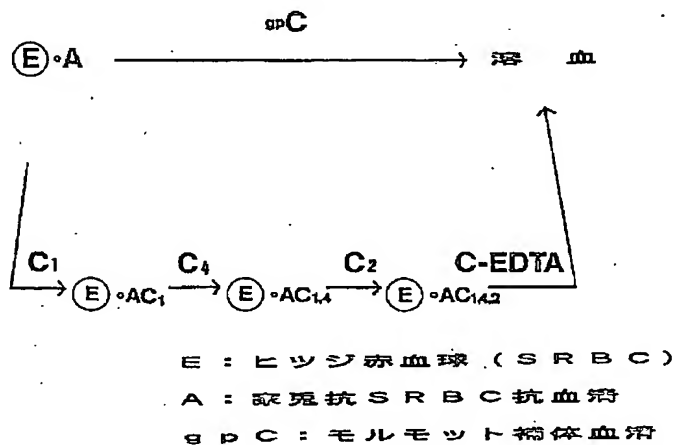
【図1】補体関与溶血反応抑制試験の反応工程式を示す図である。

【図2】g p C関与溶血反応に対するBV及びCBRの効果を示す図である。

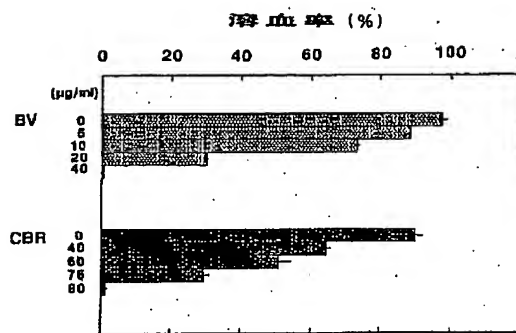
【図3】g p C関与溶血反応において、抗体で感作したSRBC(EA)に対するBVの前処理効果を示す図である。

【図4】補体関与溶血反応において、各補体成分に対するBVの効果を示す図である。

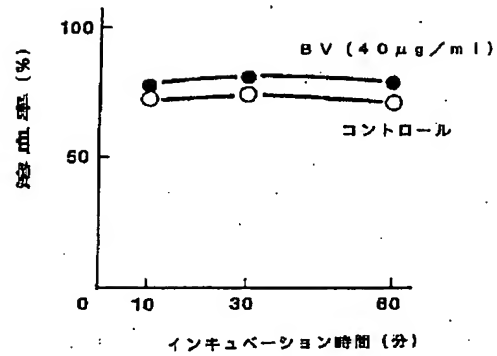
【図1】



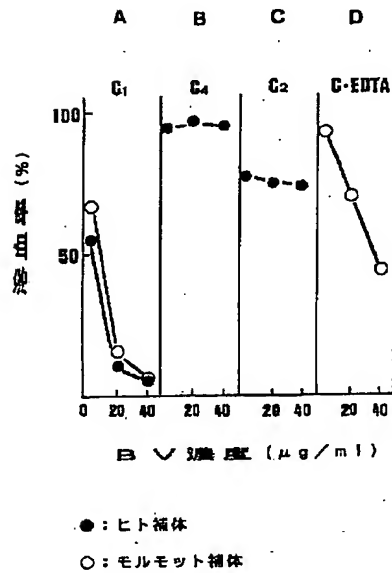
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 太治 司郎
大阪市中央区南本町3丁目6番14号

(72)発明者 森澤 成司
西宮市高塚町2丁目22番312号